

Title	Synergy of IL-12 and IL-18 for IFN- γ Gene Expression : IL-12-Induced STAT4 Contributes to IFN- γ Promoter Activation by Up-Regulating the Binding Activity of IL-18-Induced Activator Protein 1
Author(s)	中平, 雅清
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43795
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏 名	なか ひら まさ きよ 中 平 雅 清
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 6 8 6 0 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 14 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科分子病態医学専攻
学 位 論 文 名	Synergy of IL-12 and IL-18 for IFN- γ Gene Expression: IL-12-Induced STAT4 Contributes to IFN- γ Promoter Activation by Up-Regulating the Binding Activity of IL-18-Induced Activator Protein 1 (IFN- γ 遺伝子発現に対する IL-12 と IL-18 の相乗効果: IL-12 によって活性化された STAT4 は、IL-18 によって誘導された AP-1 の DNA への結合活性を上昇させることによって IFN- γ プロモーターの活性化に寄与する)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 濱 岡 利 之
	(副査) 教 授 平 野 俊 夫 教 授 宮 坂 昌 之

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

IL-12 と IL-18 は、IFN- γ 産生に対して相乗的に作用することが知られている。その相乗効果機構の1つとして、IL-12 による IL-18 レセプター (IL-18R) の発現誘導がある。又、両サイトカインが IFN- γ 産生に対して異なるシグナル経路を有する事から、レセプター下流のシグナルレベルにおいても相乗効果機構の存在が指摘されてきた。実際、IL-12 は STAT4 を、IL-18 は NF- κ B と AP-1 を活性化し、ヒト IFN- γ 遺伝子プロモーターへのこれらの転写因子の結合が報告されている。しかし、マウスでは明らかな STAT4 結合配列は確認されておらず、STAT4 がどのようにして IFN- γ プロモーターの活性化を行うのか不明であった。そこで本研究では、IL-12、IL-18 に反応できるマウス Th1 クローン 2D6 を用いて、IFN- γ 遺伝子活性化に対する IL-12 と IL-18 の相乗効果機構を STAT4 の役割に焦点を当てて解析した。

【方法】

IFN- γ 産生とその mRNA の定量には ELISA と RNase Protection Assay を用いた。各転写因子の DNA への結合は EMSA、Oligo DNA Precipitation により検討した。遺伝子活性化能については、マウス IFN- γ プロモーターにルシフェラーゼ遺伝子を連結したレポーター (standard) と、同プロモーター上の STAT 結合配列欠失レポーター (S-1) と AP-1 結合配列欠失レポーター (S-2) を用いて解析した。

【成績】

(1) IL-12-unstarved 2D6 は IL-18 刺激だけでも IL-12/IL-18 共刺激に匹敵する高い IFN- γ 産生を示したが、IL-12-starved 2D6 では IL-18R の発現レベルに差は無いにも拘らず、共刺激でしか高い IFN- γ 産生を示さなかった。又、IFN- γ mRNA の発現、ルシフェラーゼアッセイ (standard レポーター)、AP-1 の DNA への結合においても同様の傾向が見られた。従って、両サイトカインは転写レベルでも IFN- γ 産生に対して相乗的に作用すると考えられた。(2) STAT4 は、マウス IFN- γ プロモーター上の STAT common binding motif にほとんど結合しなかった。又、S-1 レポーターでは共刺激で相乗的なプロモーター活性化が見られたのに対し、S-2 レポーターでは見られなかった。つまり、相乗的な転写の活性化には、IL-18 によって誘導された AP-1 が結合する site が必要であり、STAT4 は直接プ

ロモーターへの結合をせずに転写の活性化を増強しようと考えられた。(3)そこで AP-1の主な構成成分である c-Jun と STAT4の会合を見たところ、その会合が IL-12刺激依存性に観察された。又、c-Jun のセリンリン酸化は、IL-18 刺激によって見られ、これは JNK の活性化を反映していた。(4)次に oligo DNA Precipitation により AP-1 site への各転写因子の結合を見たところ、IL-12/IL-18の群で c-Jun 及び STAT4の結合が最も多く見られた。又、過剰量の free の AP-1 site DNA の競合により、c-Jun のみならず STAT4の結合も見られなくなった。このことから、STAT4は c-Jun と会合することにより間接的に DNA へ結合すると考えられた。(5)c-Jun-STAT4複合体の量は IL-12、IL-12/IL-18の両群で大きな差は無かったにも拘らず、AP-1 site に結合した c-Jun の量は共刺激の方がはるかに多く見られた。これらのことから、共刺激によって起こる c-Jun の DNA への結合活性の増大には、c-Jun-STAT4複合体の形成の他に c-Jun のセリンリン酸化が必要であると考えられた。実際、核内の c-Jun のセリンリン酸化の割合は非常に低かったにも拘らず、DNA へ結合した c-Jun のセリンリン酸化の割合は高かった。(6)Primary Activated T cell を用いた実験でも、2D6と同様に共刺激で最も強い AP-1の誘導が見られたが、NF- κ B の活性化については IL-18、IL-12/IL-18の両群で差は無かった。このことより、IL-12からのシグナルは NF- κ B ではなく、選択的に AP-1の結合活性を上昇させると考えられた。

【総括】

IL-12と IL-18の共刺激によって各々STAT4のチロシンリン酸化とセリンリン酸化 c-Jun を含む AP-1が誘導される。これらは、核内で複合体を形成し、AP-1-binding site に対して STAT4 free AP-1に比べて強い結合活性を示す。この結果として、IL-12と IL-18による相乗的な IFN- γ 遺伝子の転写の活性化が起こると考えられた。

論文審査の結果の要旨

IL-12と IL-18は、共に IFN- γ 産生を誘導するサイトカインであり、両サイトカインは IFN- γ 産生に対して相乗的に作用する事が知られている。その相乗効果機構の1つとして、すでに IL-12による functional な IL-18レセプターの発現誘導が報告されている。又、両サイトカインが異なる signaling pathway を有する事から、シグナルレベルにおいても、相乗効果機構の存在がヒト IFN- γ 遺伝子プロモーターにおいて指摘されてきた。しかし、マウス IFN- γ 遺伝子プロモーター上には明らかな STAT4 binding site が確認されておらず、マウスにおいてどのように STAT4が IFN- γ プロモーターを活性化するのか不明であった。

本研究は、この両サイトカインによる相乗的な IFN- γ 産生機構について、主に STAT4の役割に焦点を当てて進められた。実験の結果、IL-12/IL-18共刺激により、IL-12によってチロシンリン酸化された STAT4と、IL-18によってセリンリン酸化された AP-1の構成成分である c-Jun との会合がおこることが示された。この形成された複合体は IFN- γ プロモーター上の AP-1 site に対して非常に高い binding activity を示し、その結果相乗的なプロモーターの活性化が得られると考えられた。そしてこの時活性化された STAT4は、プロモーター上のほぼ同一領域に存在する STAT common binding motif への結合を必要とせずに、相乗的なプロモーター活性化を誘導したのである。このことは、STAT が DNA への直接の結合をせずに、協調した転写制御を行うという最初の報告であり、この分野における非常に重要な概念の提示として興味深い。よって、この研究論文は、博士（医学）の学位の授与に値するものと考えられる。